

Alkaloide aus Rhamnaceen, XVIII¹⁾

Amphibin-F, -G und -H, weitere Peptidalkaloide aus *Ziziphus amphibia* A. Cheval.²⁾

Rudolf Tschesche*, Christian Spilles und Gert Eckhardt

Institut für Organische Chemie und Biochemie der Universität Bonn,
D-5300 Bonn, Meckenheimer Allee 168

Eingegangen am 12. November 1973

Aus dem komplexen Rohbasengemisch von *Ziziphus amphibia* A. Cheval. wurden neben den bereits beschriebenen Amphibinen-A³⁾, -B, -C, -D und -E⁴⁾ drei weitere Peptidalkaloide Amphibin-F, -G und -H isoliert und in der Struktur geklärt (1–3). Die Amphibine-F und -G (1, 2) zählen zu den Cyclopeptidalkaloiden mit 14gliedrigem Ringsystem aus *trans*-3-Hydroxyprolin, *p*-Hydroxystyrylamin und einer α -Aminosäure. Das Amphibin-H (3) weist ein 13gliedriges Ringsystem auf, das aus den Aminosäuren *trans*-3-Hydroxyprolin und Phenylalanin sowie aus 5-Hydroxy-2-methoxystyrylamin gebildet wird⁵⁾.

Alkaloids from Rhamnaceae, XVIII¹⁾

Amphibine-F, -G and -H, further Peptide Alkaloids from *Ziziphus amphibia* A. Cheval.²⁾

From the complex mixture of crude alkaloids from *Ziziphus amphibia* A. Cheval., in addition to the already described Amphibines-A³⁾, -B, -C, -D and -E⁴⁾, three further peptide alkaloids Amphibine-F, -G and -H have been isolated and their structures elucidated (1–3). Amphibine-F and -G (1, 2) belong to the class of cyclic peptide alkaloids having a fourteen-membered ring system made up from *trans*-3-hydroxyproline, *p*-hydroxystyrylamine and an α -aminoacid. Amphibine-H (3) has a thirteen-membered ring system formed from 5-hydroxy-2-methoxystyrylamine and the aminoacids *trans*-3-hydroxyproline and phenylalanine⁵⁾.

In früheren Mitteilungen^{3,4)} haben wir die Isolierung und Strukturaufklärung der Peptidalkaloide Amphibin-A bis -E aus der Rinde von *Ziziphus amphibia* A. Cheval. beschrieben. Durch ein modifiziertes Aufarbeitungsverfahren, bei dem die getrocknete Rinde mit einem Gemisch aus Benzol/wässrigem Ammoniak und wenig Methanol extrahiert wurde, konnte eine wesentlich höhere Ausbeute an Rohalkaloid erzielt werden als nach der bisher üblichen Methode (vgl. l. c.⁶⁾). Bei dieser Extraktion

¹⁾ XVII. Mitteil.: R. Tschesche, H. Wilhelm, E. U. Kaußmann und G. Eckhardt, Liebigs Ann. Chem., im Druck.

²⁾ Auszug aus der Dissertation C. Spilles, Univ. Bonn 1973/74.

³⁾ R. Tschesche, E. U. Kaußmann und H. W. Fehlhaber, Tetrahedron Lett. 1972, 865.

⁴⁾ R. Tschesche, E. U. Kaußmann und H. W. Fehlhaber, Chem. Ber. 105, 3094 (1972).

⁵⁾ R. Tschesche, S. T. David, J. Uhlendorf und H. W. Fehlhaber, Chem. Ber. 105, 3106 (1972); R. Tschesche, E. U. Kaußmann und G. Eckhardt, Tetrahedron Lett. 1973, 2577.

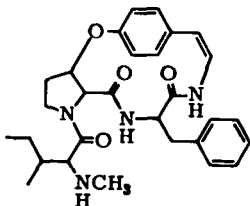
⁶⁾ R. Tschesche, R. Welters und H. W. Fehlhaber, Chem. Ber. 100, 323 (1967).

traten keine schwer trennbaren Emulsionen auf, und man erhielt nach Überführen in wäßrige Citronensäurelösung, Freisetzen der Alkaloide mit Ammoniak und Ausschütteln mit Essigester ein fast farbloses Rohbasengemisch, das von Begleitsubstanzen nahezu frei war. Der Extrakt enthielt etwa 15 Dragendorff-aktive Substanzen und wurde einer mehrstufigen Platten- bzw. Säulenchromatographie an Kieselgel unterworfen.

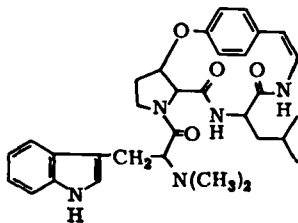
Alle Alkaloide ergaben mit Dragendorffs Reagenz eine orange, 1 und 3 mit 50proz. Schwefelsäure eine rotbraune und 2 eine rotgelbe Färbung. Allein das letztere Alkaloid reagierte positiv mit Ehrlichs Reagenz. Rasche Entfärbung sodaalkalischer Permanganatlösung wies auf eine Doppelbindung in den Alkaloiden hin.

Amphibin-F und -G ließen sich in einer Ausbeute von etwa 0.015% und Amphibin-H mit etwa 0.001% isolieren.

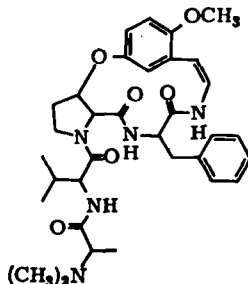
Die Summenformeln wurden durch hochauflösende Massenspektrometrie und Elementaranalyse zu $C_{29}H_{36}N_4O_4$ (1), $C_{32}H_{39}N_5O_4$ (2) und $C_{33}H_{43}N_5O_6$ (3) ermittelt.



1, Amphibin-F



2, Amphibin-G



3, Amphibin-H

In den mikrobiologischen Untersuchungen der Hydrochloride von Amphibin-F, -G und -H mit *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Pythium debaryanum* und *Trichoderma viride* zeigte sich weder antibakterielle noch fungizide Wirksamkeit *).

Absorptionsspektren

Die IR-Spektren von 1, 2 und 3 sind weitgehend denen anderer 14-⁴⁾ bzw. 13gliedriger⁵⁾ Peptidalkaloide analog. Sie weisen die typischen Absorptionen für sekundäre

*) Herrn Prof. Dr. F. Schönbeck, Universität Bonn, Institut für Pflanzenkrankheiten, danken wir für die Durchführung dieser Untersuchungen.

Amide (3400, 1680 und 1640 cm⁻¹), *N*-Methylgruppen (2770), C=C-Doppelbindungen (1610) und Phenoläther (1210 und 1025) auf. 3 zeigt bei 2820 cm⁻¹ die für *O*-Methylgruppen charakteristische Bande.

Im UV-Spektrum von Amphibin-F tritt nur eine starke Aromatenendabsorption mit schwachen Schultern bei 250 und 280 nm auf. Amphibin-G besitzt zusätzlich Absorptionsmaxima bei 290, 282 und 273 nm, die für Tryptophan als Molekülbaustein sprechen. Amphibin-H gibt Banden bei 321 und 268 nm, die für den 2,5-Dialkoxystyryl-Chromophor typisch sind⁷⁾ und somit auf ein 13gliedriges Ringsystem hinweisen⁵⁾.

Die in Deuteriochloroform aufgenommenen ¹H-NMR-Spektren zeigen bei $\delta = 0.6$ bis 1.2 ppm den Signalkomplex der *C*-Methylgruppen, entsprechend 6 Protonen für 1 und 2 und 9 Protonen für 3. Die Resonanzen der Protonen der *N,N*-Dimethylaminogruppen von 2 und 3 liegen bei $\delta = 2.5$ und 2.3 ppm. Im Spektrum von 1 erscheint das Signal für die *N*-Methylaminogruppe infolge der Kupplung mit dem N-H als Dublett bei $\delta = 2.5$ ppm. Zwischen $\delta = 2.0$ und 5.0 ppm überlagern sich die Signale der Benzylprotonen des Phenylalanins (Amphibin-F und -H) bzw. Methylprotonen in Nachbarschaft zur Indolgruppe des Tryptophans (Amphibin-G) mit denen der α -H-Atome der Aminosäuren und den C-4- und C-5-Protonen des Hydroxyprolins. Das C-2-Proton des 3-Hydroxyprolins liefert ein Dublett bei $\delta = 4.2$ ppm ($J = 5-6$ Hz; vgl. l. c.⁴⁾). Im Spektrum von 3 tritt bei $\delta = 5.95$ ppm das Dublett ($J = 9$ Hz) für das dem Aromaten benachbarte *cis*-Olefinproton auf. Das andere Olefinproton erscheint infolge der Kupplung mit dem benachbarten NH als Quartett bei $\delta = 6.85$ ppm. Der Unterschied in der chemischen Verschiebung der Olefinprotonen in den 14gliedrigen Cyclopeptidalkaloiden 1 und 2 ist sehr viel geringer (um 25 Hz); ihre Signale erscheinen als Multipllett im Bereich $\delta = 6.2$ bis 6.8 ppm. Die Absorptionen der Amid- und Aromatenprotonen liegen um $\delta = 7.0$ bis 8.0 ppm.

Massenspektren

Die massenspektrometrische Analyse von Amphibin-F bis -H gibt Aufschluß über die in den Alkaloiden enthaltenen Bausteine und deren Verknüpfung. Basispeak in allen Spektren ist jeweils das durch α -Spaltung der terminalen *N*-methylierten Aminosäure gebildete Fragment a, welches im Falle von 1 einen charakteristischen Sekundärzerfall unter Abspaltung eines Äthylradikals erleidet, woraus auf das Vorliegen von *N*-Methylisoleucin geschlossen wird⁸⁾. Das Aminfragment 4 weist bei 1 und 3 auf Phenylalanin, das Ion 5 bei 2 auf Leucin bzw. Isoleucin hin. Die Peaks der Ionen 6 und 7 sind charakteristisch für Hydroxyprolin, 8 für die in den 14gliedrigen Peptidalkaloiden 1 und 2 enthaltene Hydroxystyrylamin-Einheit und 9 für die Methoxyhydroxystyrylaminogruppe 13gliedriger Alkaloide. Das Tryptophan im Amphibin-G liefert die Fragmente 10 und 11⁹⁾.

Die schrittweise Fragmentierung der Verbindungen 1–3 folgt den in früheren Arbeiten für 13-⁵⁾ und 14gliedrige^{4,10)} Peptidalkaloide angegebenen Regeln und liefert die in Tab. 1 wiedergegebenen und mittels Hochauflösung in ihrer Zusammensetzung gesicherten Fragmente, mit deren Hilfe die Verknüpfung der Bausteine ermittelt werden kann.

⁷⁾ E. Zbiral, E. L. Ménard und J. M. Müller, *Helv. Chim. Acta* **48**, 404 (1965).

⁸⁾ K. Biemann, J. Seibel und F. Gapp, *J. Amer. Chem. Soc.* **83**, 3795 (1961).

⁹⁾ F. Weygand, A. Prox, H. H. Fessel und K. K. Sun, *Z. Naturforsch.* **20B**, 1169 (1965); P. Pfänder, *Liebigs Ann. Chem.* **707**, 209 (1967).

¹⁰⁾ H. W. Fehlhaber, *Z. Analyt. Chem.* **235**, 91 (1968).

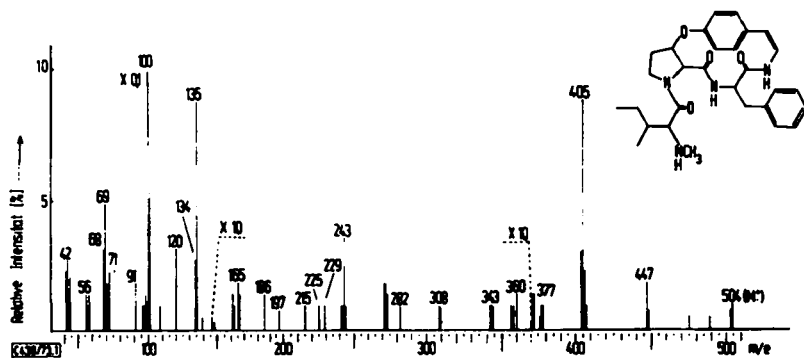


Abb. 1. Massenspektrum von Amphibin-F (1)

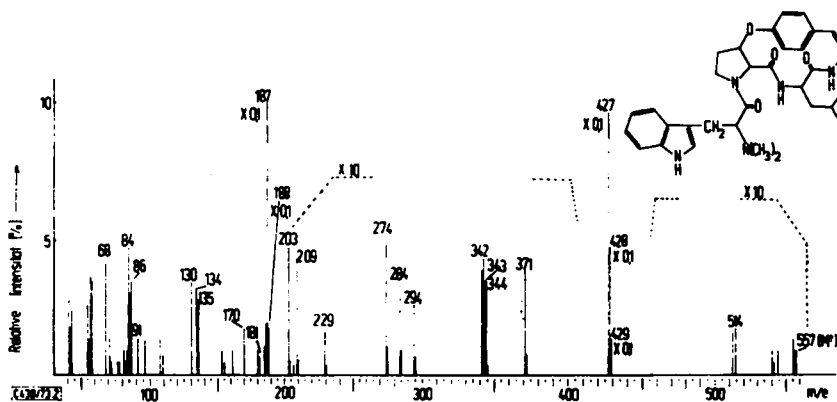


Abb. 2. Massenspektrum von Amphibin-G (2)

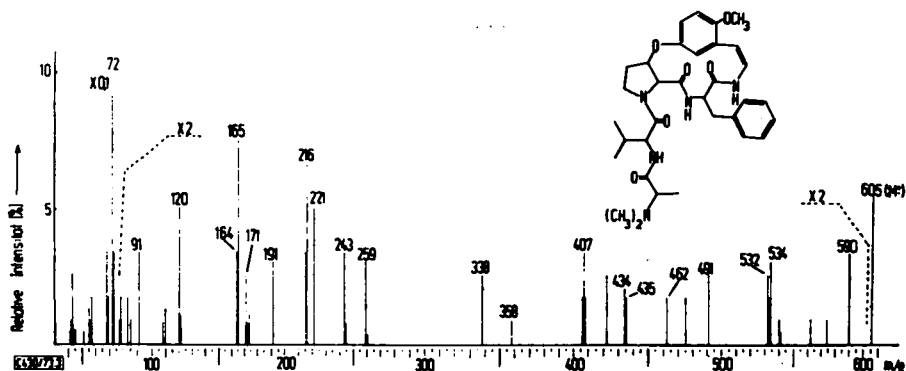
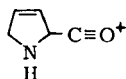


Abb. 3. Massenspektrum von Amphibin-H (3)



4, R = CH₂C₆H₅, m/e 120

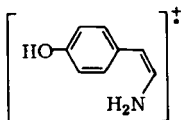
5, R = C₄H₉, m/e 86



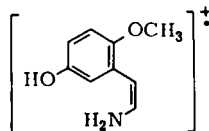
6, m/e 96



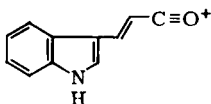
7, m/e 68



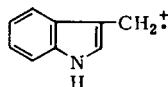
8, m/e 135



9, m/e 165



10, m/e 170



11, m/e 130

Tab. 1. Charakteristische Bruchstückionen in den Massenspektren der Amphibine.
(In den Formeln steht X für das vollständige Ringsystem)

Ion ⁺) Struktur	m/e		
	1	2	3
	R = CH(CH ₃)C ₂ H ₅ R ¹ = H R ² = CH ₂ C ₆ H ₅ R ³ = H	R = CH ₂ -Indolyl R ¹ = CH ₃ R ² = CH ₂ CH(CH ₃) ₂ R ³ = H	R = CH ₃ R ¹ = CH ₃ R ² = CH ₂ C ₆ H ₅ R ³ = OCH ₃
M⁺	504	557	605
a $H_3C-\overset{+}{N}(R^1)=CHR$	100	187	72
b $H_3C-\overset{+}{N}(R^1)=CH-CO-NH-\underset{\text{CH}(\text{CH}_3)_2}{\text{CH}}-CO-X$			590
b' $H_3C-\overset{+}{N}(R^1)=CH-CO-X$	447	427	
c $H-CO-NH-\underset{\text{CH}(\text{CH}_3)_2}{\text{CH}}-CO-X^{\bar{1}+}$			534
d $OCN-\underset{\text{CH}(\text{CH}_3)_2}{\text{CH}}-CO-X^{\bar{1}+}$			532

Tab. 1 (Fortsetzung)

e				491
f	$\text{OHC-X}^{\dagger+}$	405	371	435
g	$\text{O}\equiv\text{C-X}$	404	370	434
h	$\text{H}_2\text{-X}^+$	378	344	408
j	$\text{X}^{\dagger+}$	376	342	406
k'		197	284	
m				171
p		243	209	243
q		215	181	—
r		229	229	259
s		203	203	233
t		186	186	216
u		308	274	338

*) Die Bezeichnung der Ionen entspricht der in l. c. 4) verwendeten.

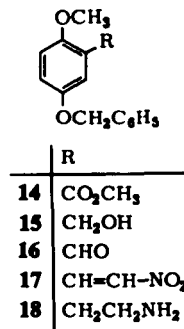
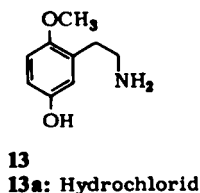
Hydrolysen

Die Alkaloide wurden katalytisch hydriert und Dihydroamphibin-F anschließend einer reduzierenden *N*-Methylierung¹¹⁾ unterworfen. In den sauren Hydrolysaten der so erhaltenen Verbindungen wurden die *N,N*-Dimethylaminosäuren papierchromatographisch und die Aminosäuren als Dansylderivate¹²⁾ dünn-schichtchromatographisch nachgewiesen. Dabei fand man *N,N*-Dimethylisoleucin, Phenylalanin und *p*-Tyramin (*N*-Methyldihydroamphibin-F), Leucin und *p*-Tyramin (Dihydroamphibin-G), *N,N*-Dimethylalanin, Valin und Phenylalanin (Dihydroamphibin-H). Im alkalischen Hydrolysat von **2** ließ sich papierchromatographisch *N,N*-Dimethyltryptophan nachweisen.

Umsetzung der Alkaloide **1** bis **3** mit Ozon und anschließende Hydrolyse mit wäßrigem Bromwasserstoff^{4,7)} erlaubte im Vergleich mit authentischem Material den papierchromatographischen Nachweis von *trans*-3-Hydroxyprolin.

Zur Identifizierung des Chromophors in **3** wurde Dihydroamphibin-H alkalisch hydrolysiert. Es entstand ein β -Phenyläthylaminderivat⁷⁾, dem aufgrund chromatographischen Vergleiches mit isomeren Verbindungen dieses Typs nur die Struktur von β -(4-Hydroxy-3-methoxyphenyl)äthylamin (**12**) oder β -(5-Hydroxy-2-methoxyphenyl)äthylamin (**13**) zukommen konnte. Kupplung des durch Hydrolyse gewonnenen Produktes sowie der synthetisch erhaltenen Verbindungen **12**¹³⁾ und **13** (s. u.) mit Diazosulfanilsäure lieferte orangefarbene Azofarbstoffe, deren UV-Spektren (vgl. l. c.¹⁴⁾) die Identität von **13** und dem aus Dihydroamphibin-H erhaltenen Phenyläthylaminderivat bewiesen.

Zur Synthese von **13** wurde Gentisinsäure-5-benzyläther¹⁵⁾ durch Methylierung mit Dimethylsulfat in **14** übergeführt und anschließend mit Lithiumaluminiumhydrid zum Benzylalkohol **15** reduziert. Oxidation mit Bleitetraacetat in Pyridin¹⁶⁾ führte zum Aldehyd **16**, der mit Nitromethan zu **17** umgesetzt wurde. Aus diesem erhielt man durch Reduktion mit Lithiumalanat das Amin **18**, das nach saurer Abspaltung der Benzylgruppe β -(5-Hydroxy-2-methoxyphenyl)äthylamin in Form seines Hydrochlorids **13a** lieferte.



¹¹⁾ R. E. Bowmann, J. Chem. Soc. **1950**, 1342.

¹²⁾ W. R. Gray und B. S. Hartley, Biochem. J. **89**, 380 (1963).

¹³⁾ F. A. Ramirez und A. Burger, J. Amer. Chem. Soc. **72**, 2781 (1950).

¹⁴⁾ R. Tschesche, L. Behrendt und H. W. Fehlhaber, Chem. Ber. **102**, 50 (1969).

¹⁵⁾ H. Baganz und R. Krattner, Arch. Pharm. (Weinheim) **293**, 393 (1960).

¹⁶⁾ R. E. Partch, Tetrahedron Lett. **1964**, 3071.

Wir danken Herrn *P. Garnier*, Montpellier, für die Beschaffung der Droge, Herrn Dr. *E. U. Kaußmann* für deren Voruntersuchung und Hinweise zu Beginn der Arbeit sowie Fräulein *G. Borchmann*, Fräulein *C. Jäschke* und Herrn *B. Lawrenz* für ihre experimentelle Mitarbeit.

Unser Dank gilt ferner der *Stiftung Volkswagenwerk* für die zur Anschaffung des Massenspektrometers bereitgestellten Mittel, sowie der *Deutschen Forschungsgemeinschaft* für die Bereitstellung des 90-MHz-Kernresonanzspektrometers und die Gewährung von Sachmitteln.

Experimenteller Teil

Die Schmelzpunkte wurden mit einem Mikroskop-Heiztisch nach Weygand, die optischen Drehungen mit dem Perkin-Elmer-Polarimeter 141 bestimmt. Zur Aufnahme der Absorptionsspektren dienten folgende Geräte: Perkin-Elmer 221 (IR), Varian A 60 und Bruker-Spektroskop HX 90 (NMR), Cary 14 (UV) und Dichrographe-2 von Roussel-Jouan (CD). Die Massenspektren wurden mit dem Massenspektrometer MS 9 (A.E.I.) durch Verdampfen der Substanzen in der Ionenquelle (bei ca. 200°C) bei einer Elektronenenergie von 70 eV aufgenommen. Die Elementaranalysen führte das Mikrochemische Laboratorium Dr. *F. Pascher*, Bonn, aus.

Zur Dünnschicht- und präparativen Schichtchromatographie (SchC) dienten Kieselgel PF₂₅₄ und G 60 (Merck) sowie Aluminiumoxid neutral (Woelm), zur Säulenchromatographie (SC) Kieselgel Woelm 0.05–0.2 mm. Für die Papierchromatographie wurde die Sorte 2043 b (Schleicher & Schüll) benutzt. Es kamen folgende Laufmittelsysteme zur Anwendung.

System A: Methylenchlorid/Methanol (50:2); System B: Chloroform/Methanol (49:1); System C: Cyclohexan/Aceton (3:2); System D: Essigester/Benzol/Äthanol (10:5:1); System E: Benzol/Pyridin/Eisessig (40:10:1)¹⁷⁾; System F: Chloroform/Benzylalkohol/Eisessig (70:30:3)¹⁸⁾; System G: n-Butanol/Chloroform (3:97)¹⁹⁾; System H: n-Butanol/Citratpuffer pH 4²⁰⁾; System I: Butanon/Eisessig/Ameisensäure/Wasser (40:2:1:6)²¹⁾; System K: n-Butanol/Eisessig/Wasser.

Isolierung und Auftrennung der Rohalkaloide: 26 kg getrocknete Rinde wurden fein gemahlen und in 4-kg-Portionen je fünfmal mit 6 Liter eines Gemisches aus Benzol/konz. Ammoniak/Methanol (100:1:1) extrahiert. Jeweils 2 Liter des gelb-grün gefärbten Extraktes wurden viermal mit je 50 ml 5proz. wäbr. Citronensäure ausgeschüttelt. Die vereinigten wäßrigen Lösungen wurden nach Filtration mit Ammoniak auf pH 8–9 eingestellt und mehrmals mit etwa 500 ml Essigester extrahiert. Nach Trocknen über Natriumsulfat und Abdampfen des Lösungsmittels i. Vak. erhielt man 28 g, entspr. etwa 0.11 % (bez. auf die trockene Droge), eines gelben schaumigen Rohalkaloidgemisches. Dieses wurde durch Chromatographie auf Kieselgel M im System A in die in l. c.⁴⁾ angegebenen Fraktionen vorgetrennt. Die weitere Reinigung erfolgte durch Säulen- oder Dickschichtchromatographie.

Amphibin-F (1): Die Fraktionen, welche das zunächst mit ZA-8⁴⁾ bezeichnete Alkaloid enthielten, wurden mittels SC im System B und anschließende mehrfache SchC in den Systemen A und D aufgetrennt. Dabei fiel 1 als farbloses, amorphes Pulver in einer Menge von etwa 110 mg an; $[\alpha]_D^{20}$: -171° ($c = 0.26$; CHCl₃).

C₂₉H₃₆N₄O₄ (504.6) Ber. N 11.10 Mol.-Masse 504.2737

Gef. N 11.02

504.2701 (MS)

¹⁷⁾ *M. Brenner, A. Niederwieser und G. Pataki, Experientia* **17**, 145 (1961).

¹⁸⁾ *Z. Deyl und J. Rosmus, J. Chromatogr.* **20**, 514 (1965).

¹⁹⁾ *M. Cole, J. C. Fletcher und A. Robson, J. Chromatogr.* **20**, 618 (1965).

²⁰⁾ *E. F. McFarren, Analyt. Chem.* **23**, 168 (1951).

²¹⁾ *L. Reis, J. Chromatogr.* **4**, 458 (1960).

IR (CHCl₃): 3380 (NH), 2780 (NCH₃), 1686 (Amide), 1620 (C=C), 1220 und 1030 cm⁻¹ (Phenoläther). — UV (Methanol): starke „Endabsorption“ mit Schultern bei 280 und 250 nm. — NMR (CDCl₃): δ = 0.6–1.0 ppm (m, 2 C-Methylgruppen), 2.50 (d, NCH₃), 4.31 (d, J = 6 Hz, 2-H am Hypro), 6.2–6.8 (m, Olefin), 6.9–7.5 (m, Aromaten, N–H).

Amphibin-G (2): Aus den mit ZA-10 und ZA-11 bezeichneten Fraktionen konnten durch SchC in den Systemen B und C sowie durch wiederholte SchC im System A 180 mg **2** abgetrennt werden, das aus Tetrachlorkohlenstoff in farblosen Nadeln vom Schmp. 182–185°C kristallisierte; $[\alpha]_D^{20}$: –218° (c = 0.24, CHCl₃).

IR (CHCl₃): 3450 und 3380 (NH), 2780 (NCH₃), 1680 (Amid), 1620 (C=C), 1225 und 1030 cm⁻¹ (Phenoläther). — UV (Methanol): $\lambda_{\max}$ 290 (log ϵ 3.71), 282 (3.79) und 273 nm (3.80). — CD (Äthanol): $\Delta\epsilon$ = +1.2 (290 nm), +1.5 (280), +1.8 (265), –12.5 (237) und +5.3 (223). — NMR (CDCl₃): δ = 0.5–1.3 ppm (m, 2 C-Methylgruppen), 2.5 (s, N(CH₃)₂), 4.3 (d, J = 6 Hz, 2-H am Hypro), 5.4 (m, N–H), 6.3–6.9 (m, Olefin, N–H), 7.0–7.7 (m, Aromaten, N–H).

C₃₂H₃₉N₅O₄ (557.7) Ber. N 12.56 Mol.-Masse 557.3002

Gef. N 12.69 557.3031 (MS)

Amphibin-H (3): Aus der ZA-12 enthaltenden Fraktion wurden durch SC im System A und mehrfache SchC in den Systemen C und D etwa 150 mg einheitliches **3** isoliert. Kristallisation aus Chloroform/Petroläther ergab ein feinkristallines Pulver vom Schmp. 205°C; $[\alpha]_D^{20}$: –570° (c = 0.12, Methanol).

IR (CHCl₃): 3320 (NH), 2820 (OCH₃), 2770 (NCH₃), 1680 und 1640 (Amide), 1610 (C=C), 1210 und 1025 cm⁻¹ (Phenoläther). — UV (Methanol): $\lambda_{\max}$ 268 (log ϵ 4.19), 321 nm (4.01). — NMR (CDCl₃): δ = 0.7 ppm (dd, J = 6 Hz, 2 C–CH₃), 1.3 (d, J = 6 Hz, C–CH₃), 2.3 (s, N(CH₃)₂), 3.8 (s, OCH₃), 5.95 (d, J = 9 Hz, 1 Olefinproton), 6.7–7.8 (m, Aromaten, NH und 1 Olefinproton), 8.55 (m, 1 NH).

C₃₃H₄₃N₅O₆ (605.7) Ber. N 11.07 Mol.-Masse 605.3213

Gef. N 10.67 605.3193 (MS)

Hydrierungen: 30 mg des jeweiligen Alkaloids wurden, in etwa 20 ml Methanol gelöst, über Palladium/Aktivkohle im offenen Gefäß hydriert. Nach etwa 5 h wurde die Lösung durch eine Glassinterfritte vom Katalysator abfiltriert und i. Vak. eingedampft. Der Rückstand konnte mittels SchC im System B chromatographisch gereinigt werden. Die Hydrierungsprodukte wurden massenspektrometrisch als Dihydroderivate identifiziert.

Dihydroamphibin-F (amorph).

C₂₉H₃₈N₄O₄ Mol.-Masse Ber. 506.2893 Gef. 506.2880 (MS).

IR (CHCl₃): 3390 (NH), 2780 (NCH₃), 1665 und 1635 (Amide), 1220 und 1035 cm⁻¹ (Phenoläther). — UV (Methanol): $\lambda_{\max}$ 225 (log ϵ 4.05) und 275 nm (3.10). — NMR (CDCl₃): δ = 0.6–1.0 ppm (m, 2 C–CH₃), 2.35 (d, NCH₃), 4.0 (d, 2-H des Hypro), 6.8–7.5 (m, Aromaten, NH).

Dihydroamphibin-G (amorph). $[\alpha]_D^{20}$: +119° (c = 0.2, CHCl₃).

C₃₂H₄₁N₅O₄ Mol.-Masse Ber. 559.3158 Gef. 559.3168 (MS).

IR (CHCl₃): 3455 und 3390 (NH), 2865 (NCH₃), 1655 (Amide), 1210 und 1040 cm⁻¹ (Phenoläther). — UV (Methanol): $\lambda_{\max}$ 273 (log ϵ 3.71), 281 (3.72) und 289 nm (3.68). — NMR (CDCl₃): δ = 0.8–1.3 ppm (m, 2 C-Methylgruppen), 2.8 (s, N(CH₃)₂), 6.0 (m, NH), 7.0–7.7 (m, Aromaten, NH).

Dihydroamphibin-H: Aus Methylenchlorid/Aceton Nadeln vom Schmp. 281°C; $[\alpha]_D^{20}$: -381° ($c = 0.15$, Methanol).

$C_{33}H_{45}N_5O_6$ Mol.-Masse Ber. 607.3369 Gef. 607.3348 (MS).

IR (CHCl₃): 3410 (NH), 2820 (OCH₃), 2770 (NCH₃), 1670 (Amide), 1230 und 1040 cm⁻¹ (Phenoläther). — UV (Methanol): $\lambda_{\max}$ 226 (log ϵ 4.1) und 290 nm (3.5). — NMR (CDCl₃): $\delta = 0.7$ ppm (dd, $J = 6$ Hz, 2 C—CH₃), 1.3 (d, $J = 6$ Hz, C—CH₃), 2.3 (s, N(CH₃)₂), 3.8 (s, OCH₃), 6.0–7.8 (m, Aromaten, NH).

N-Methyldihydroamphibin-F: 20 mg **1** wurden in 50 ml Methanol mit 0.2 ml 36proz. Formalinlösung versetzt und über Palladium/Aktivkohle bei Atmosphärendruck 6 h hydriert. Nach Zusatz von 50 ml Benzol wurde über eine mit Kieselgel in Benzol/Methanol (1:1) gefüllte Filtriersäule von Katalysator und Verunreinigungen befreit. Das Filtrat wurde i. Vak. zur Trockne gebracht und mittels SchC im System C mehrfach gereinigt. Kristallisation aus Aceton/Cyclohexan erbrachte 15 mg feiner Nadeln vom Schmp. 152–156°C; $[\alpha]_D^{20}$: -119° ($c = 0.05$, CHCl₃).

$C_{30}H_{40}N_4O_4$ Mol.-Masse Ber. 520.3050 Gef. 520.3039 (MS)

IR (CHCl₃): 3490 (NH), 2815 (NCH₃), 1670 und 1635 (Amide), 1230 und 1030 cm⁻¹ (Phenoläther). — NMR (CDCl₃): $\delta = 0.6$ –1.1 ppm (m, 2 C—CH₃), 2.45 (s, N(CH₃)₂), 4.2 (d, $J = 5$ –6 Hz, 2-H am Hypo), 6.9–7.5 (m, Aromaten, NH).

Hydrolysen: 10 mg des jeweiligen Dihydroalkaloids bzw. des *N*-Methyldihydroalkaloids im Falle von **1** wurden in 2 ml 6 N HCl im Bombenrohr 24 h auf 120–140°C erhitzt. Das Hydrolysat wurde im Exsikkator über KOH zur Trockne gebracht und in 1 ml Wasser aufgenommen.

0.2 ml der Lösung wurden zur Umwandlung der Aminosäuren in die Dansylderivate¹²⁾ mit 0.1 ml 0.1 N Hydrogencarbonatlösung und 6 mg Dansylchlorid, gelöst in 1 ml Aceton, versetzt. Nach 24 h bei Raumtemp. wurde bis zur klaren Lösung mit Aceton versetzt und die DNS-Aminosäuren durch zweidimensionale Dünnschichtchromatographie auf Kieselgel G nachgewiesen. Die erste Entwicklung wurde im System E, die zweite nach halbstündigem Trocknen der Platten bei 110°C in den Systemen F oder G vorgenommen. Die DNS-Aminosäuren sind als hellgelb fluoreszierende Flecke erkennbar. Die *N,N*-Dimethylaminosäuren konnten durch direkte Chromatographie des Hydrolysats auf Papier in den Systemen H und I unter Zuhilfenahme authentischer Vergleichssubstanzen nachgewiesen werden. Das Anfärben geschah mit Thymolblau-Reagenz²²⁾. **2** wurde zusätzlich mit Bariumhydroxid alkalisch hydrolysiert²³⁾ und zum Nachweis des *N,N*-Dimethyltryptophans auf Papier chromatographiert. Die Aminosäure wurde mit Ehrlichs Reagenz sichtbar gemacht²⁴⁾.

Nachweis des trans-3-Hydroxyprolins: Ca. 50 mg **1**, **2** oder **3** wurden jeweils nach dem Verfahren von Zbiral und Mitarbb.⁷⁾ einer Ozonolyse und anschließenden Hydrolyse unterworfen. Es wurde im Vergleich zusammen mit 4-Hydroxyprolin, *cis*-3-Hydroxyprolin und *trans*-3-Hydroxyprolin in den Systemen *tert*-Amylalkohol/2,4-Lutidin/Wasser (178:178:110)²⁵⁾ und *n*-Butanol, gesättigt mit 10proz. Diäthylamin²⁶⁾, auf Papier chromatographiert. Aufgrund der R_F -Werte und der Farbreaktionen mit Isatin-Reagenz wurde in allen Hydrolysaten eindeutig *trans*-3-Hydroxyprolin identifiziert.

²²⁾ V. M. Ingram, J. Biol. Chem. **202**, 193 (1953).

²³⁾ G. Pataki, Dünnschichtchromat. i. d. Aminosäure- und Peptidchemie, S. 135, W. de Gruyter, Berlin 1966.

²⁴⁾ R. A. Heacock und M. E. Mahon, J. Chromatogr. **17**, 338 (1965).

²⁵⁾ F. Irreverre, K. Monita, A. V. Robertson und B. Wittkop, J. Amer. Chem. Soc. **85**, 2824 (1963).

²⁶⁾ J. C. Sheehan und J. G. Whitney, J. Amer. Chem. Soc. **85**, 3863 (1963).

Alkalische Hydrolyse von Dihydroamphibin-H: 20 mg Dihydroamphibin-H wurden nach dem von Zbiral und Mitarbb.⁷⁾ angegebenen Verfahren mit wäbr.-alkoholischer Natronlauge hydrolysiert. Das Reaktionsprodukt wurde an Kieselgel durch SchC im System K getrennt. Nach Ansprühen mit sodaalkalischer Diazosulfanilsäurelösung waren zwei orangefarbene Zonen erkennbar (R_F -Werte 0.52 und 0.89). Von verschiedenen, unter gleichen Bedingungen chromatographierten Vergleichssubstanzen wiesen nur β -(5-Hydroxy-2-methoxyphenyl)-äthylamin (**13**) und β -(4-Hydroxy-3-methoxyphenyl)-äthylamin (**12**) den gleichen R_F -Wert und die gleiche Farbreaktion wie die polarere Substanz auf. Deren Kupplungsprodukt mit Diazosulfanilsäure lieferte ein UV-Absorptionsmaximum bei 331 nm (vgl. dazu l. c.¹⁴⁾).

Darstellung von β -(5-Hydroxy-2-methoxyphenyl)-äthylamin (13**)**

5-Benzoyloxy-2-methoxybenzoesäure-methylester (14**):** 20 g Gentisinsäure-5-benzyläther¹⁵⁾ wurden mit 45 ml Dimethylsulfat und 120 g Kaliumcarbonat in 1.3 Liter Aceton 24 h unter Rückfluß erhitzt. Abkühlen, Filtrieren und Einengen i. Vak. ergab in 70–75proz. Ausb. ein in feinen Nadeln vom Schmp. 42–45°C langsam kristallisierendes Öl.

IR (CHCl₃): 2820 (OCH₃), 1735 (Ester), 1240 und 1040 cm⁻¹ (Phenoläther). — NMR (CDCl₃): δ = 3.75 ppm (s, OCH₃), 3.83 (s, CO₂CH₃), 4.98 (s, OCH₂Ph), 6.95–7.5 (m, 3 Aromatenwasserstoffe) und 7.35 (s, monosubst. Aromat).

5-Benzoyloxy-2-methoxybenzylalkohol (15**):** 16 g **14** in 200 ml absol. Äther wurden unter Rühren langsam zu 5 g Lithiumalanat in 100 ml Äther gegeben und das Gemisch 24 h bei Raumtemp. gehalten. Hierauf setzte man 1 ml Wasser und 20 ml Methanol zu und filtrierte. Einengen i. Vak. und Umkristallisation des Rückstandes aus Aceton/Petroläther ergab 12 g **15** in hellgelben Blättchen vom Schmp. 48°C.

NMR (CDCl₃): δ = 3.8 ppm (s, OCH₃), 4.68 (s, —CH₂OH), 5.02 (s, —OCH₂—Ph), 6.8–7.5 (m, 3 Aromatenwasserstoffe) und 7.4 (s, 5 Aromatenwasserstoffe).

5-Benzoyloxy-2-methoxybenzaldehyd (16**):** Die Lösung von 8 g **15** in 400 ml Pyridin wurde nach Zugabe von 0.02 mol Bleitetraacetat 2 d bei Raumtemp. gerührt. Eingießen des Reaktionsansatzes in Eiswasser, Ansäuern mit HCl, Absaugen des erhaltenen Niederschlages und Umkristallisieren aus wenig Chloroform ergab Blättchen vom Schmp. 108°C (70–75%).

NMR (CDCl₃): δ = 3.8 ppm (s, OCH₃), 5.0 (s, CH₂Ph), 6.6–7.5 (m, 3 Aromatenwasserstoffe), 7.38 (s, 5 Aromatenwasserstoffe) und 10.5 (s, 1 Aldehydproton).

2,4-Dinitrophenylhydrazon von **16:** Gelbe Nadeln aus Äthanol/Wasser vom Schmp. 210°C.

5-Benzoyloxy-2-methoxy-*o*-nitrostyrol (17**):** 4 g **16** wurden nach dem Verfahren von Gairaud und Lappin²⁷⁾ in das Nitrostyrol **17** übergeführt. Orangefarbene Nadeln aus Chloroform/Petroläther vom Schmp. 98–102°C.

β -(5-Benzoyloxy-2-methoxyphenyl)-äthylamin (18**):** 2.8 g **17** wurden mit Lithiumalanat in wasserfreiem Tetrahydrofuran zum Amin reduziert (vgl. dazu l. c.²⁸⁾). Erhalten wurden 1.9 g **18** als farbloses Öl.

NMR (CDCl₃): δ = 1.6 ppm (s, NH₂), 2.78 (m, —CH₂—CH₂—), 3.65 (s, OCH₃), 4.93 (s, OCH₂Ph), 6.8 (m, 3 Aromatenwasserstoffe) und 7.4 (s, 5 Aromatenwasserstoffe).

Hydrochlorid von **18:** Versetzen von **18** mit 6 N HCl ergab ein kristallines Hydrochlorid vom Schmp. 186°C.

²⁷⁾ C. B. Gairaud und G. R. Lappin, J. Org. Chem. **18**, 1 (1953).

²⁸⁾ N. G. Gaylord, Reductions with Complex Metal Hydrides, Interscience, New York 1956.

β-(5-Hydroxy-2-methoxyphenyl)äthylamin-hydrochlorid (**13a**): Die Lösung von 1 g **18**-Hydrochlorid in 6.5 ml Eisessig und 3 ml konz. HCl wurde 3 h bei 75°C gerührt. Nach Einengen i. Vak. trat Kristallisation ein. Die Kristallmasse wurde in etwas Aceton aufgenommen, erhitzt, abgekühlt und abgesaugt. Man erhielt 0.4 g (60%) chromatographisch reines **13a** in fast farblosen Nadeln vom Schmp. 189°C.

IR (KBr): 3340 (OH), 2800–3100 (CH und Ammonium), 2500 und 2030 (Ammonium), 1595 und 1490 (Aromaten) und 1220 cm⁻¹ (Phenoläther). — NMR (D₂O): δ = 4.02 ppm (m, —CH₂—CH₂—), 4.86 (s, OCH₃) und 2.2 (m, 3 Aromatenwasserstoffe).

[C₉H₁₄NO₂]Cl (203.7) Ber. Cl 17.41 Gef. Cl 17.29

[430/73]